



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی کرمان
دانشکده داروسازی و علوم دارویی

پایان نامه دکترای عمومی داروسازی

عنوان:

سنتز سبز نانوساختارهای کیتوزان به منظور بررسی خواص
آنتی باکتریایی

توسط:

آیدا میزانی

استاد راهنما:

دکتر محمدحسن مصحفی

دکتر مهدی رنجبر



Kerman University of Medical Sciences

Faculty of Pharmacy

Pharm. D Thesis

Title:

Green synthesis of chitosan nanostructures to study its antibacterial properties

By:

Aida Mizani

Supervisor:

Dr. Mohammad Hasan Moshafi

Dr. Mehdi Ranjbar

خلاصه

مقدمه: امروزه در جامعه بشری بحث مقاومت دارویی میکروارگانیسم‌ها به یک معضل بسیار مهم و جدی تبدیل شده است. زیرا در اثر استفاده بی رویه و نابه جا از آنتی‌بیوتیک‌ها، مقاومت چند دارویی در میکروارگانیسم‌ها ایجاد شده است و هرساله مرگ و میر بسیاری در اثر ابتلا به عفونت‌های مقاوم به درمان در جهان رخ می‌دهد. لذا تلاش بر این است تا با ساخت داروی جدید با فرمولاسیون جدید، سبب کاهش عوارض ناشی از این مقاومت دارویی شد. روشی که امروزه بسیار مورد توجه است، ساخت نانوذرات جهت افزایش اثربخشی داروهاست.

روش‌ها: در این مطالعه نانوذرات کیتوزان به روش هم‌رسوبی ساخته و خصوصیات فیزیکی آن‌ها با روش‌های SEM، DLS، طیف‌سنجی IR و UV-Vis بررسی شد. سپس اثر ضد میکروبی این ذرات با روش اندازه‌گیری حداقل غلظت مهاری، اندازه‌گیری شد. در این مطالعه برای بررسی اثر ضد میکروبی از ۸ باکتری اعم از انواع گرم مثبت و گرم منفی استفاده گردید.

یافته‌ها: خصوصیات فیزیکی توسط میکروسکوپ الکترونی، اندازه ذره‌ای توسط روش DLS و خلوص نانوذرات کیتوزان توسط روش‌های طیف‌سنجی FT-IR و اسپکتروفتومتری UV-Vis ثابت شده است و نشان داده شد که ذرات، در مقیاس نانومتر و با خلوص بالا ساخته شده‌اند. خاصیت ضد میکروبی نانوذرات کیتوزان بر روی باکتری‌های گرم مثبت / استافیلوکوکوس اورئوس، استرپتوکوکوس پیوژنز، استرپتوکوکوکوس اپیدرمیدیس، میکروکوکوس لوتئوس و باکتری‌های گرم منفی / شریشیا کلای، سریشیا مارسنس، سودومونا آئروژینوزا و کلبسیلا پنومونیه به اثبات رسیده است.

نتیجه‌گیری: نانوذرات کیتوزان دارای خاصیت ضد میکروبی می‌باشند. نانوذرات ریزتر با به هم چسبیدگی کمتر، نفوذ بیشتری به میکروارگانیسم دارند. پیشنهاد می‌شود از این نانو ساختارهای زیست تخریب پذیر برای تولید فرمولاسیون ضد میکروبی در داروها و مواد آرایشی بهداشتی استفاده شود.

کلمات کلیدی: نانوذرات، کیتوزان، خاصیت ضد میکروبی

Abstract

Introduction: Nowadays in human society, the microorganism's drug resistance has become a very important and serious problem. Because of antibiotic's misusing, multidrug resistance has been established in microorganisms and every year many deaths occur due to therapy of resistance infections in the world. Therefore, an attempt is made to reduce the side effects of this drug resistance by making a new drug with a new formulation. One method that is very popular today, is to make nanoparticles to increase the effectiveness of drugs.

Methods: In this study, chitosan nanoparticles were fabricated by co-precipitation method. Physical properties of these particles were studied by scanning electron microscopy, DLS, FT-IR and UV-Vis spectrophotometry methods. Then the antimicrobial effect of these particles was measured by measuring the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) method. In this study 8 bacteria both gram positive and gram negative were used to evaluate the antimicrobial effect.

Results: Physical properties were confirmed by SEM, particle size by DLS method and purity of chitosan nanoparticles by FT-IR spectroscopy and UV-Vis spectrophotometry, that have shown chitosan particles were made in nanosize and high purity. Antimicrobial effect of chitosan nanoparticles on gram-positive bacteria such as *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus epidermidis*, and gram-negative bacteria such as *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia* has been proved.

Conclusion: Chitosan nanoparticles have antimicrobial effect. The smaller size of nanoparticles with less adhesion, have greater penetration into microorganisms. It is suggested that these biodegradable nanoparticles be used to produce antimicrobial formulations in medicines and cosmetics.

Keywords: Nanoparticles, Chitosan, Antimicrobial Effect

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
I	خلاصه
III	Abstract
IV	فهرست مطالب
VIII	فهرست جدول‌ها
۹	فهرست شکل‌ها

فصل اول: مقدمه

۲	۱-۱ پیشگفتار و هدف
۲	۲-۱ سنتز سبز
۲	۳-۱ نانوذرات
۳	۱-۳-۱ روش‌های سنتز نانوذرات
۳	۱-۱-۳-۱ هم‌رسوبی
۳	۲-۱-۳-۱ هیدروترمال
۴	۳-۱-۳-۱ تراکم گاز بی اثر
۴	۴-۱-۳-۱ نانوامولسیون
۴	۵-۱-۳-۱ ساییدگی لیزری
۴	۶-۱-۳-۱ امواج فراصوت
۵	۴-۱ ترکیبات آنتی‌باکتریایی

۵	۱-۴-۱ مقاومت میکروبی
۶	۲-۴-۱ مکانیسم های مقاومت آنتی بیوتیکی
۷	۵-۱ آزمایش های بررسی اثر آنتی باکتریایی
۷	۱-۵-۱ روش انتشار دیسک در آگار
۷	۲-۵-۱ روش کروماتوگرافی لایه نازک
۷	۱-۲-۵-۱ انتشار آگار
۷	۲-۲-۵-۱ بیواتوگرافی مستقیم
۸	۳-۲-۵-۱ سنجش زیستی با روکش آگار
۸	۳-۵-۱ رقیق سازی
۸	۱-۳-۵-۱ رقیق سازی براث
۸	۲-۳-۵-۱ رقیق سازی آگار
۹	۶-۱ کیتوزان
۹	۱-۶-۱ کاربردهای کیتوزان
۹	۱-۱-۶-۱ مهندسی بافت
۱۰	۲-۱-۶-۱ واکسیناسیون
۱۰	۳-۱-۶-۱ سیستم دارورسانی
۱۰	۴-۱-۶-۱ سیستم انتقال ژن
۱۰	۵-۱-۶-۱ خاصیت ضد توموری
۱۰	۲-۶-۱ خاصیت ضد میکروبی کیتوزان
۱۱	۱-۲-۶-۱ مکانیسم اثر ضد میکروبی کیتوزان

۱۱	۳-۶-۱ نانوذرات کیتوزان.....
۱۳	۷-۱ میکروارگانیزم‌های مورد استفاده.....
۱۳	۱-۷-۱ <i>Escherichia coli</i> (اشریشیا کلای).....
۱۳	۲-۷-۱ <i>Staphylococcus aureus</i> (استافیلوکوکوس اورئوس).....
۱۴	۳-۷-۱ <i>Streptococcus pyogenes</i> (سترپتوکوکوس پیوژنز).....
۱۴	۴-۷-۱ <i>Serratia marcescens</i> (سراتیا مارسسنس).....
۱۴	۵-۷-۱ <i>Micrococcus luteus</i> (میکروکوکوس لوتئوس).....
۱۴	۶-۷-۱ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (پسودوموناس آئروژینوزا).....
۱۵	۷-۷-۱ <i>Klebsiella pneumonia</i> (کلبسیلا پنومونیه).....
۱۵	۸-۷-۱ <i>Staphylococcus epidermidis</i> (استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس).....

فصل دوم: مواد، دستگاه‌ها و روش‌ها

۱۷	۱-۲ مواد مورد استفاده.....
۱۷	۲-۲ دستگاه‌های مورد استفاده.....
۱۸	۳-۲ روش انجام این تحقیق.....
۱۹	۴-۲ تهیه نانوذرات کیتوزان.....
۱۹	۵-۲ روش DLS برای بررسی اندازه ذره‌ای.....
۲۰	۶-۲ روش انجام طیف‌سنجی FT-IR.....
۲۰	۷-۲ روش انجام آنالیز طیف‌سنجی UV-Vis.....
۲۰	۸-۲ روش انجام آنالیز میکروسکوپ الکترونی.....

۲۰	۹-۲ بررسی خاصیت ضد میکروبی
۲۰	۱-۹-۲ میکروارگانسیم های مورد استفاده
۲۱	۲-۹-۲ روش اندازه گیری MIC
۲۱	۱۰-۲ روش تهیه محیط های کشت
۲۱	۱-۱۰-۲ محیط کشت مولر هیتون براث
۲۲	۲-۱۰-۲ محیط کشت مولر هیتون آگار
۲۲	۱۱-۲ روش رقیق سازی نمونه های مورد آزمایش
۲۳	۱۲-۲ روش تهیه ی محیط کشت جامد حاوی ماده مورد آزمایش
۲۳	۱۳-۲ روش تهیه ی تلقیح میکروبی
۲۴	۱۴-۲ روش تهیه سوسپانسیون میکروبی استاندارد
۲۴	۱۵-۲ روش تهیه استاندارد نیم مک فارلند
۲۴	۱۶-۲ روش انتقال سوسپانسیون میکروبی به پلیت

فصل سوم: نتایج

۲۷	۱-۳ آنالیز اندازه ذره ای با روش DLS
۲۸	۲-۳ آنالیز میکروسکوپ الکترونی
۲۹	۳-۳ آنالیز طیف سنجی FT-IR
۳۰	۴-۳ آنالیز طیف سنجی UV-Vis
۳۱	۵-۳ بررسی خاصیت ضد میکروبی نمونه های سنتز شده

۳۱ ۳-۵-۱ نتایج بررسی MIC نمونه ی A1

۳۴ ۳-۵-۲ نتایج بررسی MIC نمونه ی A2

۳۶ ۳-۵-۳ نتایج بررسی MIC نمونه ی A3

فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری

۴۱ ۴-۱ بحث

۴۳ ۴-۲ نتیجه گیری

۴۳ ۴-۳ پیشنهادات

۴۴ منابع

Pharm. D Thesis کرمان داروسازي دانشكده

فهرست جدول‌ها

عنوان	صفحه
جدول ۱-۲ مشخصات مواد مورد استفاده در این پژوهش	۱۷
جدول ۲-۲ مشخصات دستگاه‌های مورد استفاده در این پژوهش	۱۷
جدول ۳-۲ مشخصات میکروارگانیزم‌های مورد استفاده در این پژوهش	۲۱
جدول ۴-۲ غلظت نمونه‌ی سنتز شده در هر یک از لوله‌ها	۲۳
جدول ۱-۳ نتایج اثرات ضد میکروبی نانوذره A1 در رقت‌های مختلف بر روی باکتری‌های مورد آزمایش	۳۳
جدول ۲-۳ نتایج اثرات ضد میکروبی نانوذره A2 در رقت‌های مختلف بر روی باکتری‌های مورد آزمایش	۳۶
جدول ۳-۳ نتایج اثرات ضد میکروبی نانوذره A3 در رقت‌های مختلف بر روی باکتری‌های مورد آزمایش	۳۹

فهرست شکل‌ها

عنوان	صفحه
شکل ۱-۱ ساختار شیمیایی کیتوزان.....	۹
شکل ۱-۲ محصول حاصل از مرحله دوم سنتز نانوذرات حین رفلاکس.....	۱۸
شکل ۲-۲ ترکیب نهایی جمع آوری شده در ارلن مایر پس از اتمام مراحل سنتز.....	۱۸
شکل ۳-۲ پودر سفید و براق نانوذرات کیتوزان ساخته شده در انتهای مراحل سنتز.....	۱۹
شکل ۱-۳ آنالیز اندازه ذره‌ای نمونه A ₁	۲۷
شکل ۲-۳ آنالیز اندازه ذره‌ای نمونه A ₂	۲۷
شکل ۳-۳ آنالیز اندازه ذره‌ای نمونه A ₃	۲۸
شکل ۴-۳ تصویر میکروسکوپ الکترونی نمونه A ₁ در مقیاس ۲۰۰ نانومتر.....	۲۸
شکل ۵-۳ تصویر میکروسکوپ الکترونی نمونه A ₂ در مقیاس ۲۰۰ نانومتر.....	۲۹
شکل ۶-۳ تصویر میکروسکوپ الکترونی نمونه A ₃ در مقیاس ۲۰۰ نانومتر.....	۲۹
شکل ۷-۳ طیف FT-IR نانوذرات کیتوزان سنتز شده.....	۳۰
شکل ۸-۳ طیف‌سنجی UV-Vis نانوذرات کیتوزان سنتز شده.....	۳۰
شکل ۹-۳ محیط‌های کشت مربوط به اندازه‌گیری MIC نمونه A ₁	۳۲
شکل ۱۰-۳ محیط‌های کشت مربوط به اندازه‌گیری MIC نمونه A ₂	۳۴
شکل ۱۱-۳ محیط‌های کشت مربوط به اندازه‌گیری MIC نمونه A ₃	۳

منابع

- [1] Zhu X, Pathakoti K, Hwang H. **Green synthesis, characterization and applications of nanoparticles**. Jackson: Elsevier 2019(Vol 1): 223-63.
- [2] Ghosh S. **Green Synthesis, Characterization and applications of nanoparticles**. Mmumbai: Elsevier 2019(Vol 1):75-86.
- [3] Panarin E. Biologically active polymer nanosystems. **Russ Chem Bull** 2017;66:1812-20.
- [4] Kumar VV, Anthony SP. **Surface Chemistry of Nanobiomaterials**. Tamil Nadu: Elsevier: 2016(Vol 3):265-300.
- [5] Choi HS, Frangioni JV. Nanoparticles for biomedical imaging; fundamentals of clinical translation. **Mol Imaging** 2010;9:7290.2010. 00031.
- [6] Rane AV, Kanny K, Abitha V, Thomas S. **Synthesis of inorganic nanomaterials**. 1th ed. London: Woodhead Publishing 2018(Vol 1):121-39.
- [7] Hajipour MJ, Fromm KM, Ashkarran AA, de Aberasturi DJ, de Larramendi IR, Rojo T, *et al*. Antibacterial properties of nanoparticles. **Trends Biochem Sci** 2012;30:499-511.
- [8] Frieri M, Kumar K, Boutin A. Antibiotic resistance. **J Infect Public Health** 2017;10:369-78.
- [9] Chellat MF, Raguz L, Riedl R. Targeting antibiotic resistance. **Angew Chem Int** 2016;55:6600-26.
- [10] Giedraitienė A, Vitkauskienė A, Naginienė R, Pavilionis A. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. **Medicina** 2011;47:19.
- [11] Balouiri M, Sadiki M, Ibensouda SK. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity. **J Pharm Anal** 2016:71-9.
- [12] Costa E, Silva S, Costa M, Pereira M, Campos D, Odila J. Chitosan mouthwash: Toxicity and *in vivo* validation. **Carbohydr Polym** 2014:385-92.
- [13] Younes I, Rinaudo M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. **Mar Drugs** 2015;13:1133-74.
- [14] Vaezifar S, Razavi S, Golozar MA, Karbasi S, Morshed M, Kamali M. Effects of some parameters on particle size distribution of chitosan nanoparticles prepared by ionic gelation method. **J Clust Sci** 2013;24:891-903.
- [15] Rajam M, Pulavendran S, Rose C, Mandal A. Chitosan nanoparticles as a dual growth factor delivery system for tissue engineering applications. **Int J Pharm** 2011;410:145-52.

- [16] Shi G-N, Zhang C-N, Xu R, Niu J-F, Song H-J, Zhang X-Y, *et al.* Enhanced antitumor immunity by targeting dendritic cells with tumor cell lysate-loaded chitosan nanoparticles vaccine. **Biomaterials** 2017;113:191-202.
- [17] Rajitha P, Gopinath D, Biswas R, Sabitha M, Jayakumar R. Chitosan nanoparticles in drug therapy of infectious and inflammatory diseases. **Expert Opin Drug Del** 2016;13:1177-94.
- [18] Akbuga J, Ozbas-Turan S, Ekentok C. **Percutaneous penetration enhancers chemical methods in penetration enhancement**. 1th ed. Berlin: Springer- Verlag Berlin Heidelberg 2016(Vol 1):337-51.
- [19] Qi L, Xu Z, Chen M. In vitro and in vivo suppression of hepatocellular carcinoma growth by chitosan nanoparticles. **Eur J Cancer** 2007;43:184-93.
- [20] Mousavi SA, Ghotaslou R, Kordi S, Khoramdel A, Aeenfar A, Kahjough ST, *et al.* Antibacterial and antifungal effects of chitosan nanoparticles on tissue conditioners of complete dentures. **Int J Biol Macromol** 2018;118:881-5.
- [21] Tamara FR, Lin C, Mi F-L, Ho Y-C. Antibacterial effects of chitosan/cationic peptide nanoparticles. **Nanomaterials** 2018;8:1-15.
- [22] Costa E, Silva S, Tavaría F, Pintado M. Study of the effects of chitosan upon *Streptococcus mutans* adherence and biofilm formation. **Anaerobe** 2013;20:27-31.
- [23] Kim J-S, Shin D-H. Inhibitory effect on *Streptococcus mutans* and mechanical properties of the chitosan containing composite resin. **Restor Dent Endod** 2013;38:36-42.
- [24] Wang S-L, Hiep ĐM, Luong PM, Vui NT, Đình TM, Dzung NA. Preparation of chitosan nanoparticles by spray drying, and their antibacterial activity. **Res Microbiol** 2014;40:2165-75.
- [25] Lee S, Kim SK, Lee DY, Chae SY, Byun Y. Pharmacokinetics of a new, orally available ceftriaxone formulation in physical complexation with a cationic analogue of bile acid in rats. **Antimicrob Agents Chemother** 2006;50:1869-71.
- [26] Lee S, Kim SK, Lee DY, Park K, Kumar TS, Chae SY, *et al.* Cationic analog of deoxycholate as an oral delivery carrier for ceftriaxone. **J Pharm Sci** 2005;94:2541-8.
- [27] Cho S-W, Lee JS, Choi S-H. Enhanced oral bioavailability of poorly absorbed drugs. I. Screening of absorption carrier for the ceftriaxone complex. **J Pharm Sci** 2004;93:612-20.
- [28] Briones E, Colino CI, Lanao JM. Delivery systems to increase the selectivity of antibiotics in phagocytic cells. **J Control Release** 2008;125:210-27.

- [29] Zaki NM, Hafez MM. Enhanced antibacterial effect of ceftriaxone sodium-loaded chitosan nanoparticles against intracellular *Salmonella typhimurium*. **AAPS Pharm Sci Tech** 2012;411-21.
- [30] Nandanan E, Jana NR, Ying JY. Functionalization of gold nanospheres and nanorods by chitosan oligosaccharide derivatives. **Adv Mater** 2008;20:2068-73.
- [31] Sarkar P, Parameswaran C, Harish C, Chandra MB, Grace AN. Kinetics of silver nanoparticle growth using DMF as reductant–Effect of surfactants. **Open J Adv Mater Res** 2014;30-5.
- [32] Kozák O, Praus P, Dvorský R. Optical properties of ZnS nanoparticles precipitated at various molar ratios of sulphide and zinc ions and stabilized by CTAB. **Chalcogenide Lett** 2012;9(10):413-9.
- [33] Isomaa B, Sjöblom G. The effect of CTAB, a cationic surfactant, on the absorption rate of [14 C] tripalmitate from a test meal in the rat. **Food Chem Toxicol** 1975;13:517-20.
- [34] Khan Z, Al-Thabaiti SA, Obaid AY, Khan ZA, Al-Youbi AO. Effects of solvents on the stability and morphology of CTAB-stabilized silver nanoparticles. **Colloid Surface A** 2011;390:120-5.
- [35] Li Y, Yang Y, Sun H, Chung S, Kumacheva E, Liu K. Polynanomers from polymerization of inorganic nanoparticles: **Mat Sci Eng** 2016:1-31.
- [36] Percival SL, Williams D, Cooper T, Randle J. **Biofilms in infection prevention and control: A healthcare handbook**. 1th ed. London: Academic Press 2014:89-117.
- [37] Wirtanen G, Salo S. **Handbook of hygiene control in the food industry**. 2th ed. London: Woodhead Publishing 2016:55-79.
- [38] Wong SS, Yuen K-Y. *Streptococcus pyogenes* and re-emergence of scarlet fever as a public health problem. **Emerg Microbes Infect** 2012:1-10.
- [39] Buckle J. **Clinical aromatherapy: Essential oils in practice**. 3th ed. London: Churchill Livingstone 2014:131-159.
- [40] Mauclaire L, Egli M. Effect of simulated microgravity on growth and production of exopolymeric substances of *Micrococcus luteus* space and earth isolates. **FEMS Immunol Med Mic** 2010:350-6.
- [41] Colmer-Hamood J, Dzvova N, Kruczek C, Hamood A. *In vitro* analysis of *Pseudomonas aeruginosa* virulence using conditions that mimic the environment at specific infection sites. **Prog Mol Biol Transl Sci** 2016:151-191.

- Chabi R, Momtaz H. Virulence factors and antibiotic resistance properties of the [42]
Staphylococcus epidermidis strains isolated from hospital infections in Ahvaz, Iran. **Trop**
Med Health 2019;47-56.

Pharm. D Thesis کرمان داروسازی دانشکده



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی کرمان
دانشکده داروسازی

پایان نامه خانم آیدا میزانی دانشجوی داروسازی ورودی ۹۲ به شماره ۱۲۰۹

تحت عنوان:

سنتز نانوساختارهای کیتوزان به منظور بررسی خواص آنتی باکتریایی

استاد (اساتید) راهنما:

دکتر محمدحسن مصطفی

دکتر مهدی رنجبر

هیئت محترم داوران:

۲- دکتر صالحه صبوری

۱- دکتر عباس پرداختی

در تاریخ ۹۹/۰۷/۰۵ مورد ارزیابی قرار گرفت و با نمره (با عدد) ۱۸/۸۳
(با حروف) به تصویب رسید.

دکتر مصطفی پورنامدآوی
رئیس اداره پایان نامه

محمدرضا نخعی
کارشناس اداره پایان نامه



دکتر میترا مهربانی
معاون پژوهشی دانشکده